



TITLE:

オートラジオグラフィーによるラット腎の蓚酸分布と蓚酸カルシウム結晶付着部位の検討

AUTHOR(S):

石井, 啓一; 杉本, 俊門; 上川, 禎則; 金澤, 利直; 仲谷, 達也; 山本, 啓介; 岸本, 武利; 船江, 良彦

CITATION:

石井, 啓一 ...[et al]. オートラジオグラフィーによるラット腎の蓚酸分布と蓚酸カルシウム結晶付着部位の検討. 泌尿器科紀要 1998, 44(4): 245-251

ISSUE DATE:

1998-04

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/116165>

RIGHT:

オートラジオグラフィーによるラット腎の蓚酸分布と 蓚酸カルシウム結晶付着部位の検討

大阪市立大学医学部泌尿器科学教室 (主任 : 岸本武利教授)

石井 啓一, 杉本 俊門, 上川 禎則, 金澤 利直

仲谷 達也, 山本 啓介, 岸本 武利

大阪市立大学医学部生体調節物質研究部門 (主任 : 船江良彦教授)

船 江 良 彦

¹⁴C-OXALATE AUTORADIOGRAPHIC STUDIES ON DISTRIBUTION OF OXALATE AND CALCIUM OXALATE CRYSTAL FIXATION IN RAT KIDNEY

Keiichi ISHII, Toshikado SUGIMOTO, Sadanori KAMIKAWA, Toshinao KANAZAWA,
Tatsuya NAKATANI, Keisuke YAMAMOTO and Taketoshi KISHIMOTO

From the Department of Urology, Osaka City University Medical School

Yoshihiko FUNAE

From the Laboratory of Chemistry, Osaka City University Medical School

To elucidate the intrarenal distribution of oxalate and to reveal the first site of calcium oxalate crystal fixation along the nephron, we carried out ¹⁴C-oxalate renal microautoradiography by the thaw mount method 30, 60 and 90 min after intravenous administration of ¹⁴C-oxalate, in normal rats and in hyperoxaluric rats fed a vitamin B₆-deficient diet for 4 and 9 weeks. In normal rats, radioactivity was observed in the entire kidney area at 30 min after the injection and at 90 min there was radioactivity only in the papilla, where radioactivity appeared in the parenchyma, namely the epithelial cells of collecting ducts and the surrounding interstitial tissue. In hyperoxaluric rats, microautoradiograms showed the spotted deposits of ¹⁴C-oxalate in both renal papilla and medulla. In 600× magnification of the autoradiograms, most of the deposits were detected in the epithelial cells of collecting ducts and the surrounding interstitial tissue. These deposits were identified by a polarizing microscope and X-ray microanalysis as crystal deposits of calcium oxalate.

These results indicated that oxalate remained for an extended period of time in the epithelial cells of collecting ducts and in the surrounding interstitial tissue in renal papilla, and the calcium oxalate crystals fixed to the same tissue was the first step in the development of calcium oxalate stones.

(Acta Urol. Jpn. 44 : 245-251, 1998)

Key words: Oxalate, Urolithiasis, Microautoradiography, Renal distribution

緒 言

全尿路結石症の約80%を占める蓚酸カルシウムおよびこれを含む混合結石に関して、その発症機序は、いまだ解明されていない。蓚酸カルシウム結石症の発症機序を明らかにするうえで、カルシウムおよび蓚酸の生体内動態を解明することが重要と思われる。カルシウムの生体内動態に関してはかなり解明が進んでいるが、蓚酸の生体内動態に関しては不明なことが多い。最も重要と考えられる腎における蓚酸の動態に関しては、糸球体で濾過され、近位尿細管で分泌を受け尿中に排泄されると、ほぼ一致した見解が示されているが、これより遠位側のネフロンにおける動態はい

まだ十分に明らかにされていない。最近、上川ら^{1,2)}は、¹⁴C-標識蓚酸を用い、dry mount 法³⁾による腎ミクロオートラジオグラフィーを施行し、蓚酸のラット腎内分布を検討した。その結果、静注された¹⁴C-標識蓚酸は腎乳頭部、特に集合管周囲組織に長時間停滞することが示唆されたが、dry mount 法によるミクロオートラジオグラムでは組織の損傷が生じることが多かったため、蓚酸の乳頭部における停滞部位を組織学的に同定することは困難であった。

そこで本研究では、腎、特に乳頭部における蓚酸の局在部位を組織学的に明らかにするため、より鮮明な像が得られる thaw mount 法⁴⁾による ¹⁴C-標識蓚酸の経時的腎ミクロオートラジオグラフィーを施行し検

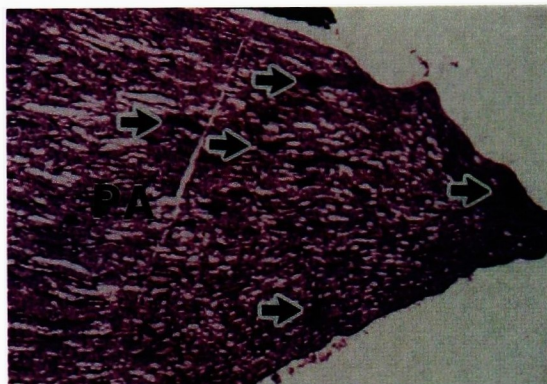


Fig. 1. Microautoradiogram showing the renal distribution of ^{14}C -oxalate in a normal rat 90 min after injection at a dose of 37 MBq per 1 kg of body weight, reduced from $\times 40$. There is radioactivity of ^{14}C -oxalate only in the papilla (PA), where the accumulation of radioactivity is indicated by arrow marks.

討した。また、ビタミン B₆ 欠乏食で誘発された過酸化尿酸症ラットにおいて、同様の方法による腎マイクロオートラジオグラムを作成し、尿酸がネフロンに沿ったどの部位において最初に集積するのか、また集積した尿酸が実際にカルシウム結晶として沈着しているのかどうかをX線分析法により検討した。

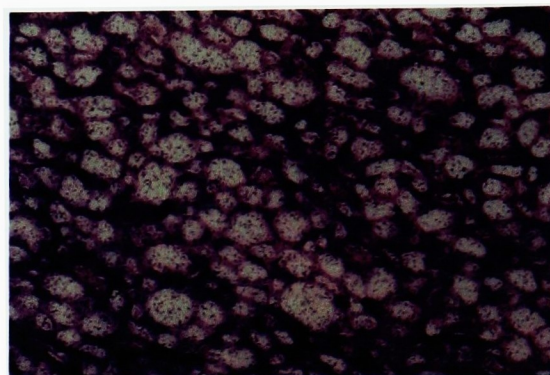
対象ならびに方法

1. 正常ラットにおける ^{14}C -標識尿酸の経時的腎マイクロオートラジオグラムの作成方法

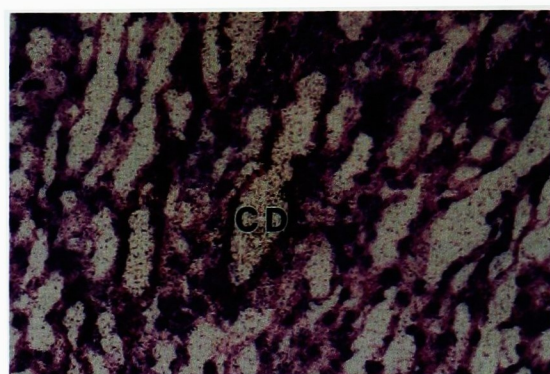
通常飼料で飼育した10週齢 Sprague-Dawley 系雄性ラット18匹を3群に分け、各実験動物に尾静脈より体重 1 kg あたり 37 MBq の ^{14}C -標識尿酸 (分子量 93.5, specific activity 4.03 GBq/mmol, Amersham England) を静注後、第一群は30分、第二群は60分、第三群は90分で殺処分し、直ちに腎を摘出した。さらに摘出腎をメスで細切ることにより、皮質、髓質、乳頭部すべてを含む厚さ約 2 mm の横断切片3個を得た。腎マイクロオートラジオグラフィーは、水平らの thaw mount 法⁴⁾に従い施行した。得られた横断切片を液体プロパンにて凍結固定後、クリオスタット (Leitz Kryostat 1720, Leica, Heidelberg, Germany) にて厚さ 5 μm の試料切片を作成し、あらかじめ乳剤を塗布したスライドガラスに密着させ、暗箱内にて6週間露出した。その後、現像、定着を行い、組織を塩基性フクシンおよびメチレン青にて染色して光学顕微鏡下に ^{14}C -標識尿酸集積部位を観察した。

2. 過酸化尿酸症ラットにおける ^{14}C -標識尿酸の腎マイクロオートラジオグラムの作成方法

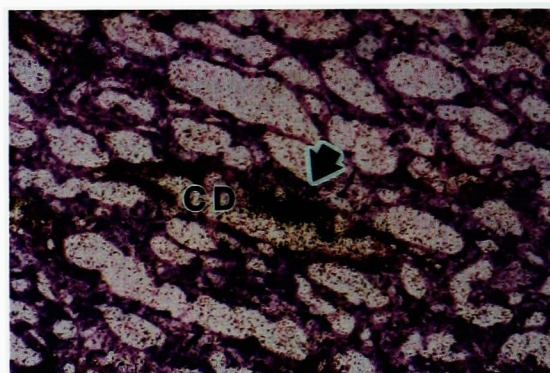
6週齢のSD系ラット12匹に対してビタミン B₆ 欠



(A)



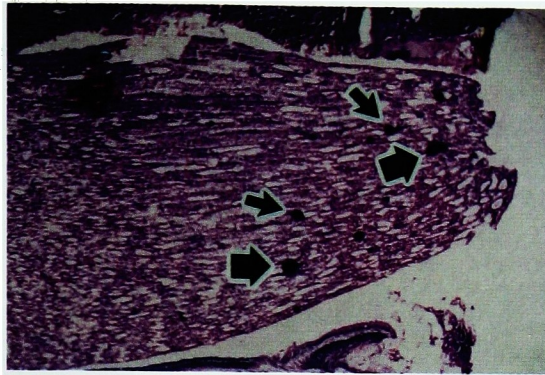
(B)



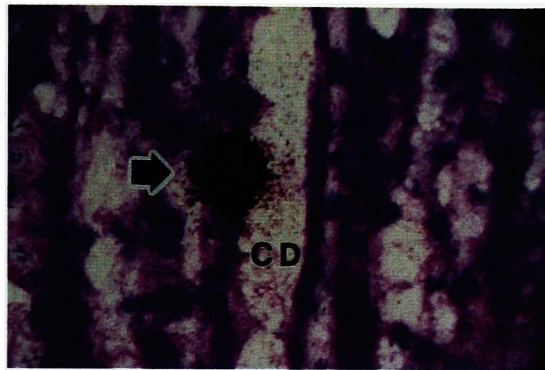
(C)

Fig. 2. Distribution of ^{14}C -oxalate in the renal papilla of a normal rat kidney. (A) 30 min, (B) 60 min and (C) 90 min after injection at a dose of 37 MBq per 1 kg of body weight, reduced from $\times 600$. At 30 and 60 min, the microautoradiograms show radioactivity of ^{14}C -oxalate in the entire area and at 90 min most ^{14}C -oxalate radioactivity has accumulated in the epithelial cells of collecting ducts (CD) and the surrounding interstitial tissue (marked by an arrow).

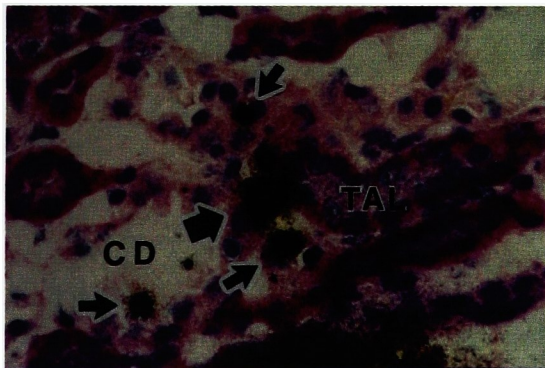
乏食による飼育を開始し、6匹は4週間後、他の6匹は9週間後に、体重 1 kg あたり 37 MBq の ^{14}C -標識尿酸を3日間24時間毎に尾静脈より投与した。最終投与より40時間後にラットを殺処分し、直ちに腎を摘出した。腎マイクロオートラジオグラフィーは、実験1



(A)



(B)



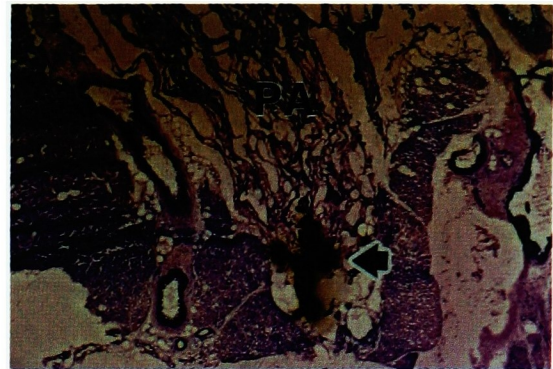
(C)

Fig. 3. (A) Distribution of ^{14}C -oxalate in the papilla and inner medulla of vitamin B_6 -deficient rat (4W) kidney 40 h after injection at a dose of 37 MBq per 1 kg of body weight, reduced from $\times 40$. (B) and (C) reduced from $\times 600$ in the papilla and inner medulla, respectively. Arrow marks show the deposits of ^{14}C -oxalate. When the microautoradiogram reduced from $\times 600$ is obtained, most deposits are detected in the epithelial cells of collecting ducts (CD) and the surrounding interstitial tissue. TAL; thick ascending limb

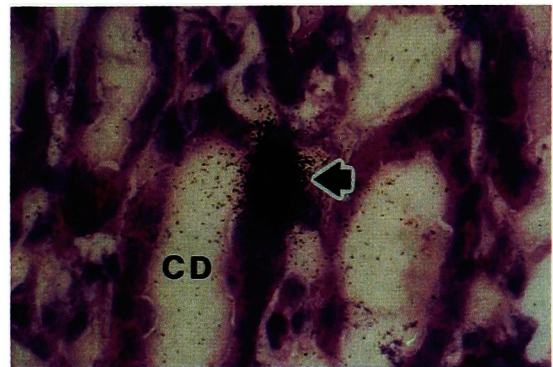
と同様に thaw mount 法にて施行し、光学顕微鏡にて観察した。

3. ^{14}C -標識蓚酸の集積部位のX線分析

4週間および9週間ビタミン B_6 欠乏食飼育ラット



(A)



(B)

Fig. 4. Distribution of ^{14}C -oxalate in the papilla of vitamin B_6 -deficient rat (9W) kidney 40 h after injection at a dose of 37 MBq per 1 kg of body weight. (A) and (B) are reduced from $\times 40$ and $\times 600$, respectively. (A) An arrow shows the large deposit of ^{14}C -oxalate at the papilla (PA) tip. (B) An arrow shows the deposit in the epithelial cells of collecting ducts (CD).

による試料切片上の ^{14}C -標識蓚酸の集積部位を偏光顕微鏡⁵⁾で観察した。さらに、スライドガラス内にはカルシウムが含有されているために、カルシウムが含有されていない硬質塩化ビニル板をスライドガラス大に切り取り、それに同試料から作成した凍結切片を附着した。偏光顕微鏡下に結晶構造物の確認される部位をトリミングして電子顕微鏡観察用ホルダに載せた後、導電性をもたせるために、イオンスパッタリング装置 (Fine coat JEF-1100, JEOL, 東京) にて試料上に金を蒸着し、電子顕微鏡下にエネルギー分散型X線分光器 (EDAX 9800, 日本フィリップス, 東京) を用いて電子線照射微小部X線分析法⁶⁾を施行することにより、そのX線スペクトルから試料切片上の ^{14}C -標識蓚酸集積部位における構成元素の同定を行った。また走査電子顕微鏡観察下にて、上記X線スペクトルで認められた各元素の特異的なピークにおいての特性X線像を得、放射活性集積部位における各元



Fig. 5. Observation of ^{14}C -oxalate deposits in renal microautoradiograms of vitamin B_6 -deficient rats (4W) using a polarizing microscope, reduced from $\times 600$. These deposits are identified as crystals.

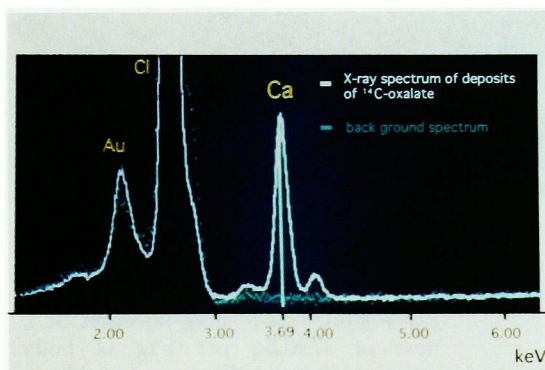


Fig. 6. X-ray spectrum of ^{14}C -oxalate deposit in the renal microautoradiogram of vitamin B_6 -deficient rat (4W).

素の分布状態を解析した。

結 果

1. ラットにおける ^{14}C -標識蓚酸の経時的腎マイクロオートラジオグラム

^{14}C -標識蓚酸を静注後30, 60, 90分における腎マイクロオートラジオグラムの弱拡大像においては、アイソトープ静注後30分で腎全体に ^{14}C -標識蓚酸の放射活性が認められたが、時間経過とともに放射活性の減少がみられ、90分後では髄質の乳頭部にのみ集積、局在することが明瞭に認められた (Fig. 1)。Fig. 2 は、髄質における経時的变化を示すマイクロオートラジオグラム強拡大像である。腎髄質とくに乳頭部では、静注後30分では放射活性は集合管腔内、集合管上皮および間質にほぼ均一に認められており、60分後でも同様の結果であった。しかし、90分後では集合管腔内に放射活性はほとんど消失していたにもかかわらず、集合管上皮細胞内およびその周囲の間質には、30分および60分後では認められなかったような強い ^{14}C -標識

蓚酸の集積像が観察された。

2. 過蓚酸尿症ラットにおける ^{14}C -標識蓚酸の腎マイクロオートラジオグラム

4週間ビタミン B_6 欠乏食飼育ラットにおける ^{14}C -標識蓚酸の腎マイクロオートラジオグラム弱拡大像において、乳頭部と髄質内帯に ^{14}C -標識蓚酸の大きな集積像が明確に観察された。強拡大像においては、弱拡大像でみられた大きな集積像以外に、小さな径の斑状の集積像が集合管の上皮細胞内およびその周囲の間質に認められた。Fig. 3 に、乳頭部と髄質内帯における ^{14}C -標識蓚酸の腎マイクロオートラジオグラム弱拡大像、乳頭部の強拡大像、および髄質内帯における強拡大像を示す。

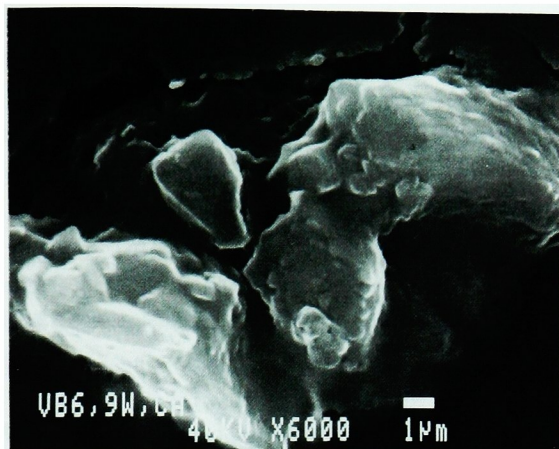
9週間ビタミン B_6 欠乏食飼育ラットにおける腎マイクロオートラジオグラム弱拡大像において、4週間後の場合と同様に乳頭部と髄質内帯に ^{14}C -標識蓚酸集積像がみられたが、とくに乳頭部の先端にはより大きな集積像が認められた (Fig. 4)。強拡大像においては、4週間後の場合と同様の小さな径の放射活性の斑状集積像が集合管の上皮細胞内に認められた。また、その数は明らかに増加していた。

3. ^{14}C -標識蓚酸集積部位のX線分析

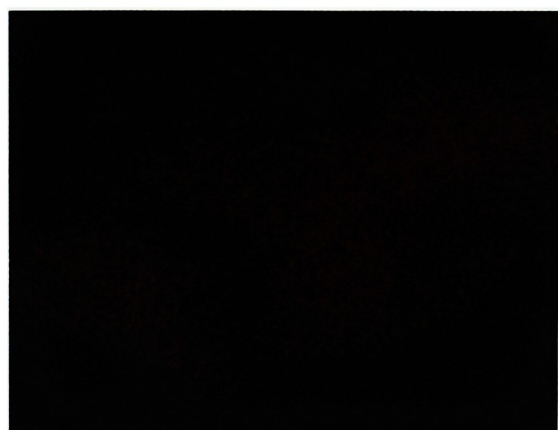
4週間および9週間ビタミン B_6 欠乏食飼育ラットにおける腎マイクロオートラジオグラムで認められた ^{14}C -標識蓚酸の集積像を、偏光顕微鏡にて観察したところ、 ^{14}C -標識蓚酸の集積は、結晶構造として存在することが確認された。4週間ビタミン B_6 欠乏食飼育ラットの腎髄質内帯で認められた ^{14}C -標識蓚酸の集積像の偏光顕微鏡像を、Fig. 5 に示す。同試料切片の結晶をX線分析法にて検索したところ、そのスペクトルにおいて、塩素と金と考えられるピーク以外にカルシウムに特異的な 3.69 keV に高いピークが認められた (Fig. 6)。さらに、走査電子顕微鏡観察下にて認められた結晶構造上に、カルシウムに特異的なピークにおいての特性X線像が得られた。なお、試料切片上のほかのいかなる部位においてもカルシウムのピークは検出されなかった。Fig. 7 に、9週間ビタミン B_6 欠乏食飼育ラットの腎乳頭部における走査電子顕微鏡像、およびその像に重ねて得られたカルシウムの特性X線像を示す。

考 察

蓚酸カルシウム結石症の発症要因とその機序を根本的に解明するためには、蓚酸およびカルシウムの吸収、生体内分布、代謝、排泄を含めた生体内動態を明らかにすることが肝要であり、特に腎における蓚酸の動態を解明することが最も重要と考えられる。しかし、蓚酸に関して、尿中濃度の測定は可能となったものの⁷⁾、血中ならびに組織中濃度の測定方法は未だ確



(A)



(B)

Fig. 7. (A) Observation of ^{14}C -oxalate deposits in renal microautoradiograms of vitamin B₆-deficient rats (9W) using a scanning electron microscope. (B) Ca X-ray image of the same ^{14}C -oxalate deposits as above by X-ray microanalysis. These deposits are identified as crystal deposits containing calcium.

立されておらず、アイソトープ (^{14}C -標識蓚酸) を用いて、その生体内動態の解明が行われているにすぎない。すなわち、 ^{14}C -標識蓚酸の pharmacokinetic study により、蓚酸の生体内分布容積はイヌリンの約 1.7 倍で、その血中半減期はイヌリンとほぼ同値の 20 分であり、静注された ^{14}C -標識蓚酸の一部は胆汁中に排泄されるが、その大部分は尿中より排泄されると報告されている^{8,9)}。また、経口投与された外因性蓚酸のうち腸管で吸収されるのはわずかであり^{10,11)}、静注された外因性蓚酸は、腎、骨および肝に集積することが明らかにされている。蓚酸の腎内動態に関しては、 ^{14}C -標識蓚酸のクリアランスおよび micro-puncture study により、蓚酸は糸球体で自由に濾過され、近位尿細管において分泌されるとともに、一部再吸収を受け、蓚酸の腎クリアランスはイヌリンクリアランスの 1.1 から 1.3 倍であることが明らかにされて

いる^{8,12,13)}。さらに最近では、Leiske ら¹⁴⁾は、サル腎尿細管上皮由来の BSC-1 細胞を用いた研究にて、蓚酸はイオン化した状態だけでなく、蓚酸カルシウムの結晶としても endocytosis により、尿細管腔内から尿細管上皮細胞内へ取り込まれることも報告されている。このように蓚酸の腎内動態に関しては、糸球体および近位尿細管での動態は明らかにされつつあるものの、それより遠位側のヘンレ係蹄、遠位尿細管および集合管において、蓚酸はどのような挙動をするのかは不明である。

蓚酸は血中においては蛋白と結合せず、生体内において最終代謝産物であるため、静注された ^{14}C -標識蓚酸は内因性蓚酸と同じ動態を示すと考えられる¹³⁾。また、本実験でラットに投与した ^{14}C -標識蓚酸の量は 37 MBq/kg b.w. であり、蓚酸投与量を specific activity から算出すると、ラット 1 匹あたり約 200 μg の蓚酸急性負荷に相当する。しかし、以前われわれが施行した pharmacokinetic study の結果では、同量の蓚酸負荷時においても、蓚酸は 4 時間で生体内よりほとんど消失し、血中半減期やイヌリンクリアランスなどの各パラメーターには有意な変化はなかった¹⁾。したがって今回の実験では、静注された ^{14}C -標識蓚酸は内因性蓚酸の腎排泄動態に影響を与えないものと考えられた。

経時的腎マイクロオートラジオグラム弱拡大像において、 ^{14}C -標識蓚酸投与直後は腎全体に放射活性が認められたが、時間経過とともに腎皮質や髄質外帯から放射活性の減少がみられた。しかし、髄質、特に乳頭部には、投与後 90 分でも放射活性はなお強く残存していた。強拡大像において、 ^{14}C -標識蓚酸の経時的腎内分布を詳細に検討したところ、アイソトープ投与後 30 分では、放射活性は髄質の組織内においてはほぼ均一に認められたが、90 分では髄質の尿細管管腔内からは消失し、ほとんどの放射活性は、とくに乳頭部において、腎の解剖学的構造と尿細管の形態的特徴より集合管と同定される管腔の上皮細胞内およびその周囲の間質に集積して存在していた。 ^{14}C -標識蓚酸 pharmacokinetic study において、 ^{14}C -標識蓚酸の血中半減期は約 20 分で、90 分後の ^{14}C -標識蓚酸の尿中回収率は 90% 以上であると報告されていることより^{8,9)}、計算上静注後 90 分で集合管管腔内を流れる ^{14}C -標識蓚酸はほとんど皆無であると考えられる。また、蓚酸の生体内分布容積は体重の約 60% と算出され、さらに、ラットにおけるマクロオートラジオグラフィによる検討から、イヌリンが腎よりほとんど排泄された時点においても、蓚酸は腎のとくに乳頭部において一時的に残存停滞することが示されたことより¹⁵⁾、蓚酸はイヌリンに比し、より自由に生体内に拡散していくことが示唆されている。以上のことから

ら、ラットに投与された ^{14}C -標識蓚酸は、腎髄質とくに乳頭部において、その機序は不明であるが、集合管腔内から集合管上皮細胞内および周囲の間質に取り込まれ、尿中に大部分が排泄された後も、 ^{14}C -標識蓚酸は一時的にこの部位に停滞し、高濃度で存在することが強く示唆された。

Finlayson ら¹⁶⁾は、腎における尿流速、蓚酸およびカルシウムの濃度などを仮定したモデル実験から、尿路に停滞がない場合、尿路結石の核となる結晶がたとえ生じても尿細管腔内で trap されるほど結晶が大きく成長することは皆無であると推論している。そして尿路結石症の発症には、析出した結晶がネフロンの中のいずれかの部位に付着する (fixed particle) 必要があり、この付着した結晶が結石にまで成長していくと推測した。しかしこの結晶が付着し成長していく部位、すなわち結石形成の最初の段階がどの部位で起こるかに関しては、尿細管細胞内または腎間質における可能性を示唆する報告が近年散見される^{1,17,18)}が、未だ明確にはされていない。そこで本研究においては、蓚酸カルシウム結晶が最初に沈着する部位を組織学的に明らかにするため、蓚酸カルシウム結石発症モデルとしてビタミン B_6 欠乏食で誘導した過蓚酸尿症ラットに対し ^{14}C -標識蓚酸の腎マイクロオートラジオグラフィーを施行した。ビタミン B_6 は蓚酸の前駆物質である glyoxalate とグリシンの変換の際の補酵素として働き、その欠乏により glyoxalate の蓄積、内因性蓚酸産生の亢進が生じることで過蓚酸尿症が惹起される^{11,19)}。蓚酸カルシウム結石発症モデルとしては、ほかに外因性蓚酸の大量投与²⁰⁾やエチレングリコールなどの蓚酸の前駆体の投与²¹⁾があるが、いずれも腎全体に蓚酸カルシウムが沈着し、著しく腎機能が低下する。それに対して、ビタミン B_6 欠乏食を用いたこの結石発症モデルでは、尿中蓚酸排泄量が正常の約2倍と他のモデルに比し軽度の増加であり、腎機能も保たれている。また実際、生体内で蓚酸カルシウム結石生成に関与する蓚酸は、その大部分がグリシンやアスコルビン酸由来の内因性のものであると報告されている²²⁾。以上のことから、ビタミン B_6 欠乏食による過蓚酸尿症ラットは、より臨床像に近い尿路結石発症モデルと考えられる。よって本研究において用いた、4週間ビタミン B_6 欠乏食飼育の腎マイクロオートラジオグラムでは、弱拡大像において、乳頭部と髄質内帯に ^{14}C -標識蓚酸の大きな集積像が明確に観察され、強拡大像では斑状の集積像が集合管上皮細胞内およびその周囲の間質に認められた。9週間飼育ラットにおいては、4週間に比し集積像の数が増加するとともに、より大きな集積像がみられ、特に乳頭部の先端に大きな集積像が認められた。本研究では ^{14}C -標識蓚酸最終投与後40時間でラットを殺処分し、腎ミクロ

オートラジオグラフィーを施行した。 ^{14}C -標識蓚酸の尿中回収率は4時間で約95%^{8,9)}であることを考慮すると、腎マイクロオートラジオグラム上で認められた ^{14}C -標識蓚酸の集積像は、ネフロンを流れている蓚酸ではなく、腎組織中に蓄積、あるいは沈着した蓚酸と考えられた。さらに、腎マイクロオートラジオグラム上の ^{14}C -標識蓚酸集積部位を偏光顕微鏡にて観察すると、この集積像は結晶構造を呈していることが観察された。さらに集積部位における構成元素を同定するためにX線分析を施行したところ、カルシウム、塩素、金に特異的なX線スペクトルのピークが検出された。しかし、塩素のピークは試料切片の付着固定に使用した塩化ビニル板に由来するものであり、また金のピークは、分析に際し、試料上に蒸着塗布した金に由来するものと考えられた。試料切片上の ^{14}C -標識蓚酸の集積部位以外では、塩素と金のピークは検出されるにもかかわらず、カルシウムのピークはまったく検出されず、また、集積部位上の方にカルシウムのピークでの特性X線像が得られた。したがって、過蓚酸尿症ラットにおける腎マイクロオートラジオグラム上に認められた ^{14}C -標識蓚酸の集積像は、単に蓚酸が集積しているのではなく蓚酸カルシウム結晶として存在していることが確認された。

上川ら^{1,2)}は、 ^{14}C -標識蓚酸を用いたラットにおけるオートラジオグラフィーにより、蓚酸の腎内分布を検討し、正常ラットでは、静注された ^{14}C -標識蓚酸は腎乳頭部、特に集合管周囲組織に長時間停滞することを示唆し、さらに尿路結石モデルラットにおいては、 ^{14}C -標識蓚酸を投与した後に、斑状の集積像がおもに集合管の管腔周囲組織に認められたと報告している。その際、蓚酸は易水溶性であることより、作成過程において一切融解させない dry mount 法を用いて ^{14}C -標識蓚酸の腎マイクロオートラジオグラフィーを施行しているが、得られた組織像では細胞間隙が広がり、組織の損傷が生じることが多かった。そこで本研究では、腎マイクロオートラジオグラフィーにおいて、dry mount 法と異なり、より鮮明な像が得られる thaw mount 法を施行することで、蓚酸の腎内動態、とくに髄質および乳頭部での動態をさらに詳細に検討した。また、蓚酸カルシウム結石発症モデルラットを用い、同様に thaw mount 法にて ^{14}C -標識蓚酸の腎マイクロオートラジオグラムを得、蓚酸カルシウム結晶が生成されるか否か、生成されるとすればネフロンのいずれの部位に析出沈着するかを、X線分析法を併用することにより詳細に検討した。Thaw mount 法では、凍結乾燥を行わないため組織が半融解し、標本作成中に組織内で蓚酸が移動する可能性があるが、少なくとも蓚酸カルシウム結晶として組織に沈着した蓚酸の移動は生じないと考えられた。Thaw mount

法による今回の腎ミクロオートラジオグラフィーの結果は, 上川らの dry mount 法によるものと同様であり, しかも得られた組織像は非常に鮮明であるため, 蓚酸の腎組織内局在部位をより詳細に, かつ正確に同定することができた。

結 語

正常ラットにおける thaw mount 法を用いた ^{14}C -標識蓚酸の経時的腎ミクロオートラジオグラムでは, 投与された ^{14}C -標識蓚酸はその大部分が尿中に排泄された後も, 集合管上皮細胞内およびその周囲の間質に一時的に停滞することが観察され, この蓚酸の停滞が蓚酸カルシウム結石発症にかかわっていることが強く示唆された。事実, 過蓚酸尿症ラットにおいては, 集合管上皮細胞内およびその周囲の間質での蓚酸カルシウム結晶の析出沈着が最初に出現し, この析出沈着した結晶が次第に成長することが, X線分析を併用した ^{14}C -標識蓚酸腎ミクロオートラジオグラフィーにより証明された。

稿を終えるにあたり, 本研究に御協力頂いた当教室各位, 本学薬理学教室 岩尾 洋教授, 雪村時人助教授, 三浦克之講師ならびに大日本製薬総合研究所 宮崎 亀博士, 藤井敏彦博士, 松本 聡博士に深く感謝します。

なお, 本研究は文部省科学研究費 (課題番号06671608) の助成を受け, 研究成果は第83回日本泌尿器科学会総会, 第45回日本泌尿器科学会中部総会, 1995 European Symposium on Urolithiasis, 1995 3rd Urological Research Forum Okinawa, 第5回日本尿路結石研究会において発表した。

文 献

- 1) 上川禎則, 杉本俊門, 金澤利直, ほか: オートラジオグラフィーによるラット腎内の蓚酸分布の解析. 日泌尿会誌 **87**: 900-908, 1996
- 2) Kamikawa S, Sugimoto T, Kanazawa T, et al.: Autoradiographic study on calcium oxalate crystal fixation in rat kidney. Urolithiasis Consensus and Controversies, Manchester: 429-430, 1995
- 3) Stumpf WE: Tissue preparation for the autoradiographic location of hormones. In: introduction to quantitative cytochemistry-II. Edited by Wied GL and Bahr GF, pp. 507-526, Academic Press, New York and London, 1970
- 4) Stumpf WE: Thaw-mount オートラジオグラフィー: 手法と有用性. 生物 医学領域における最新オートラジオグラフィーの手法と応用. 水平敏知編, pp. 86-96, 学際企画, 東京, 1985
- 5) 伊東丈夫: 特殊技術 (観察方法) への応用. 光学顕微鏡写真撮影法. 伊東丈夫編, pp. 118-122, 学際企画, 東京, 1993
- 6) 水平敏知: 生物試料の光・電子線・X線による微小部分分析法. 組織細胞化学の技術, 無機物と色素. 三嶋 豊, 水平敏知, 鈴木庸之, ほか編, pp. 41-76, 朝倉書店, 東京, 1994
- 7) Imaoka S, Funae Y, Sugimoto T, et al.: Specific and rapid assay of urinary oxalic acid using high-performance liquid chromatography. Anal Biochem **128**: 459-464, 1983
- 8) Sugimoto T, Osswald H, Yamamoto K, et al.: Fate of circulating oxalate in rats. Eur Urol **23**: 485-489, 1993
- 9) 杉本俊門, 加藤禎一, 松村俊宏, ほか: ラットにおける蓚酸の生体内動態. 泌尿紀要 **34**: 1135-1140, 1988
- 10) Bannwart C, Hagmaier V, Ritschauer G, et al.: Absorption of oxalic acids in rats by means of a ^{14}C method. Eur Urol **5**: 276-277, 1979
- 11) 金澤利直: 蓚酸カルシウム結石の発症機序に関する実験的研究. 阪市医誌 **39**: 427-439, 1990
- 12) Knight TF, Senekjian HO and Weinmann EJ: Effect of para-aminohippurate on renal transport of oxalate. Kidney Int **15**: 38-42, 1979
- 13) Hautmann R and Osswald H: Renal handling of oxalate: a micropuncture study in rat. Naunyn-Schmidbergs Arch Pharmacol **304**: 277-281, 1978
- 14) Lieske JC, Spargo BH and Toback FG: Endocytosis of calcium oxalate crystals and proliferation of renal tubular epithelial cells in a patient with type 1 primary hyperoxaluria. J Urol **148**: 1517-1519, 1992
- 15) Sugimoto T, Osswald H, Kishimoto T, et al.: Autoradiographic study of oxalate in rats. Invest Urol **3**: 216-219, 1989
- 16) Finlayson B and Reid F: The expectation of free and fixed particles in urinary stone disease. Invest Urol **15**: 442-448, 1978
- 17) Kohri K, Nomura S, Kitamura Y, et al.: Structure and expression of the mRNA encoding urinary stone protein (Osteopontin). J Biol Chem **268**: 15180-15184, 1993
- 18) 伊藤尊一郎: 尿路結石マトリクス発現におけるマクロファージとサイトカインの関与. 日泌尿会誌 **87**: 865-874, 1996
- 19) Gershoff SN and Faragalla FF: Endogenous oxalate synthesis and glycine, serine, deoxypyridoxine interrelationships in vitamin B₆-deficient rats. J Biol Chem **234**: 2391-2393, 1959
- 20) Khan SR, Finlayson B and Hackett RL: Histologic study of the early events in oxalate induced intranephrotic calculosis. Invest Urol **17**: 199-202, 1979
- 21) Lyon ES, Borden TA and Vermeulen GW: Experimental oxalate lithiasis produced with ethylene glycol. Invest Urol **4**: 143-151, 1966
- 22) Richardson KE and Farinelli MP: The pathways of oxalate biosynthesis. In: Urolithiasis, Clinical and Basic Research. Edited by Smith LH, Robertson WG and Finlayson B, pp. 855-863, Plenum Press, New York, 1981

(Received on October 22, 1997)
(Accepted on February 9, 1998)